

SPEZIELLE, NICHT-PROTEINOGENE AMINOSÄUREN UND IHRE ANWENDUNG ZUR HERSTELLUNG VON PEPTIDDERIVATEN

Von

K. KOVÁCS, B. PENKE, J. CZOMBOS, J. PETRES und L. BALÁSPIRI

Institut für Organische Chemie der Attila-József-Universität, Szeged

(Eingegangen am 7. Dezember 1970)

Die Herstellung der Aminosäuren und ihrer Peptidderivate von spezieller Struktur ist ein interessantes Gebiet der Peptidchemie. Wir berichten über die Aminomalonsäuren, aus Acylaminosäuren gewonnene Diazoketone und Pipecolinsäuren und ihre Peptidderivate. Die Umlagerung der Diazoketone gibt optisch aktive β -Aminosäuren.

Die Herstellung und Untersuchung der speziell aufgebauten, nicht-proteinogenen Aminosäuren und ihrer Peptidderivate ist ein interessantes Gebiet der Peptidchemie. Die Literatur hielt einige solcher Aminosäuren früher als unnatürliche Aminosäuren in Evidenz. Diese Benennung wich der Bezeichnung „nicht-proteinogene Aminosäuren“, denn sie kommen in den Proteinen zwar nicht vor, sind aber vielfach in natürlichen Peptiden oder anderen natürlichen Stoffen anzutreffen.

Die nicht-proteinogenen Aminosäuren unterscheiden sich teils strukturell, teils sterisch von den eiweißaufbauenden Aminosäuren. So ist z.B. das Strukturisomere des Threonins das Homoserin; der Imidazolring des Histidins ist im β -Pyrazolylalanin durch einen Pyrazolring substituiert; anstatt des Pyrrolidinringes des Prolins finden wir in der Azetidin-2-carbonsäure einen Azetidinring bzw. Piperidinring in der Pipecolinsäure. BELL [1] und FOWDEN [2] gaben 1964 in ihrer Studie eine Zusammenfassung der bis dahin bekannten Daten bzgl. der nicht-proteinogenen Aminosäuren. Seither wurden immer mehr, eigentlich natürliche, aber nicht als Eiweissbausteine fungierende Aminosäuren bekannt.

Im Institut für Organische Chemie der Universität Szeged wurden schon im Jahre 1937 Untersuchungen in dieser Richtung unternommen. BRUCKNER und IVÁNOVICS [3] isolierten aus der Kapselsubstanz des Anthrax-Bazillus ein Polypeptid. Dieses Polypeptid, das die Verfasser Anthrax-Polypeptid nannten, war zu D-Glutaminsäure hydrolisierbar. Nachdem im Aufbau der Proteine Aminosäuren mit L-Konfiguration teilnehmen, gehört im Grunde genommen auch die über D-Konfiguration verfügende Glutaminsäure eigentlich zu den nicht-eiweißbildenden Aminosäuren. Im Laufe der späteren Untersuchungen stellte sich auch heraus [4], daß die Struktur dieses Polypeptids selbst eine ungewöhnliche Erscheinung darstellt, indem es entgegen den in den Proteinen herrschenden, dominierenden α -Peptidbindungen γ -Peptidbindungen enthält. Die D-Konfiguration, die γ -Glutamyl-

bindung, gibt eine gute Erklärung für die außergewöhnliche Virulenz des Anthrax-Bazillus, da die speziell gebaute Kapselsubstanz den Bakteriumkörper vor den Angriffen der proteolytischen Enzyme schützt. Diese Untersuchungen haben darauf aufmerksam gemacht, daß das Erscheinen der speziell gebauten Aminosäuren mit irgendeiner besonderen biologischen Rolle gepaart ist.

So wurde in Verbindung mit der Erkennung der Struktur zahlreicher Antibiotika verständlich, daß auch sie verschiedene Aminosäuren enthalten. D-Aminosäure findet sich u.a. im Penicillin, im Gramicidin und Cycloserin, in denen die D-Konfiguration nicht selten auch mit strukturellen Besonderheiten kombiniert ist.

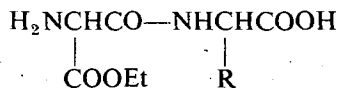
Das Organisch-Chemische Institut der Universität Szeged, welches zusammen mit der Universität sein 50-jähriges Bestehen feiert, betrachtet als einen Teil seiner traditionellen Themen die Chemie der Aminosäuren von spezieller Struktur und ihrer Peptide. Von unseren Ergebnissen möchten wir hier über jene berichten, die wir in Verbindung mit Untersuchungen über die Aminomalonsäure, die zur Entstehung von β -Aminosäure führenden Diazoketone, die Pípecolinsäure und ihre Derivate verzeichnen konnten.

a) *Die Aminomalonsäure und die aminomalonsäurehaltigen Peptide*

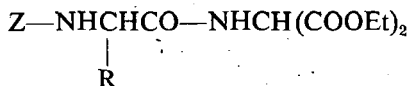
Die Aminomalonsäure — eine von BAEYER [5] bereits beschriebene Verbindung — erschien in mancher Hinsicht als interessant. Vor allem waren aminomalonsäurehaltige Peptide kaum bekannt. SCHNEIDER [6] hatte zwar Alanin und Glycin enthaltende Aminomalonsäure-Peptide beschrieben und FRANKEL und Mitarb. [7] über die Synthese der Poly-DL-aminomalonsäure berichtet, doch wurden weitere derartige Peptide in der Fachliteratur nicht erwähnt. Die Aminomalonsäure dürfte unseres Erachtens in peptidchemischer Hinsicht schon allein deshalb von Bedeutung sein, weil sie auch als Ausgangsglied der homologen Reihe der Aminodicarbonsäuren zu betrachten ist. Die beiden nächsten Glieder dieser Homologenreihe aber, Asparaginsäure und Glutaminsäure, sind zwei typische proteinogene Aminosäuren und es ist zu erwarten, daß in biologisch aktiven Peptiden die adäquaten Aminosäurekomponenten durch Aminomalonsäureanteile zu ersetzen sein werden.

Andererseits kann die Aminomalonsäure auch als eine das Glycin substituierende Aminosäure in Betracht kommen. Hier handelt es sich nicht um eine formelle Substitution, sondern darum, daß in den aminomalonsäurehaltigen Peptiden — infolge von Decarboxylierung — diese Komponente in einen Glycinanteil umgewandelt werden kann.

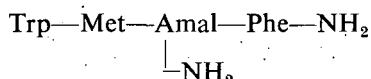
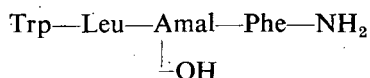
Ausgehend von dem Aminomalonsäurediäthylester [8] haben wir den Carboxy-aminomalonsäure-diäthylester hergestellt und aus dieser Verbindung durch Hydrolyse mit verdünnter Lauge den entsprechenden Halbester erhalten, der nach einer aktivierten Estermethode oder mit Dicyclohexylcarbodiimid mit einem eine andere Aminokomponente vertretenden Aminosäurenabkömmling in Peptidbindung gebracht werden kann. Bei Anwendung dieser Methode ist der Halbesteranteil der Aminomalonsäure in ein N-Terminal überführbar.



Die Aminomalonsäure kann auch als C-terminaler Aminosäurerest existieren. Die Carbobenzoxy-aminosäure kann mit Hilfe der üblichen Peptid-Kupplungsmethoden mit Aminomalonsäurediäthylester als Aminokomponente zur Reaktion gebracht werden.



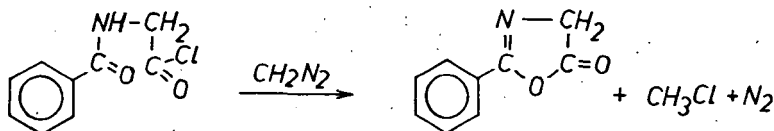
Wir haben zahlreiche Oligopeptide mit Aminomalonsäureanteil hergestellt, in denen die Aminomalonsäure als N-Terminal und als C-Terminal gleichermaßen vorkommt. Besonders hervorzuheben sind zwei Gastrinanalogue-Derivate, in denen anstatt des Asparaginsäureteiles ein Aminomalonsäurerest eingebaut ist.



b) *Synthese von Diazoketonen aus Acylaminosäuren unter Verwendung von gemischten Anhydriden bzw. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid*

Die Diazoketone sind vor allem präparativ wichtig. Diese Zwischenprodukte der zur Herstellung homologer Carbonsäuren geeigneten ARNDT—EISTERTSchen Synthese [9] sind mittels WOLFFScher Umlagerung außer zur Synthese derartiger Carbonsäuren auch noch zur Herstellung von Carbonsäureestern und Carbonsäureamiden brauchbar [10]. Ihre vielseitige Reaktionsbereitschaft und Anwendbarkeit ist neuestens von WEYGAND und BESTMANN zusammengefaßt worden [11]. Unter den Diazoketoaminosäuren befinden sich auch biologisch aktive Verbindungen [12].

Da die WOLFFSche Umlagerung der optisch aktiven Diazoketone ohne Racemisierung verläuft [13], besteht die Möglichkeit, von optisch aktiven α -Aminosäuren ausgehend, β -Aminosäuren gleicher Konfiguration herzustellen. BALENOVIĆ und Mitarb. [14] haben aus Phthalyl-aminosäure-chloriden mit Diazomethan eine Reihe von Phthalimido- α -diazoketonen und durch WOLFFSche Umlagerung derselben optisch aktive β -Aminosäuren synthetisiert. BALENOVIĆ und Mitarb. haben vor allem Phthalyl-aminosäuren angewandt, weil so keine Möglichkeit zur Oxazolonbildung besteht. Nach ihrer Vorstellung, die sich auf die Versuche von KARRER und BUSSMANN [15] stützt, werden die Acylaminosäurechloride $\text{R—CO—NH—CH(R)—COOH}$ bei der Reaktion mit Diazomethan nicht in Diazoketone, sondern in substituierte Oxazolonderivate umgewandelt. So entsteht aus Hippursäurechlorid 2-Phenylloxazon:



Im Falle von Phthalylaminosäuren kann keine Enolisation erfolgen, weil der Aminosäure-Stickstoff darin tertiär geworden ist, so daß kein Oxazolonring gebildet werden kann. Als Schutzgruppe bei der Synthese von homologen α - bzw. β -Aminodicarbonsäuren haben WEYGAND den Trifluoracetylrest [16] und RUDINGER die Toluolsulfonyl-Gruppe [17] benutzt, doch drohte in diesen Fällen infolge der Anwendung von ω -Aminocarbonsäurechloriden nicht die Gefahr einer Oxazolonbildung.

Zu der von α -Aminosäuren ausgehenden Diazoketonsynthese sind — unseren Befunden gemäß — Benzyloxycarbonyl- und *tert*-Butyloxycarbonyl-aminosäuren gleichermaßen verwendbar. Die Elektronenaffinität der Carbonylgruppe der Schutzgruppen vom Typ des Urethans ist wegen des benachbarten Sauerstoffes geringer als die anderer Acylgruppen, deshalb kommt es nicht zur Enolisation und zur Bildung eines Oxazolones. Im Falle von Hydroxyaminosäuren (Serin, Threonin) sind die Diazoketone wegen der Bildung mehrerer Nebenprodukte jedoch schwer zu isolieren.

Anstatt der Acylaminosäurechloride ist es zweckmäßiger, andere in der Peptidchemie verbreitete Acylaminosäurederivate mit aktivierter Carboxylgruppe zu benutzen. Nach unseren Versuchen reagieren die mit Chlorkohlensäure-isobutylester oder mit Chlorkohlensäure-äthylester gebildeten gemischten Anhydride der Acylaminosäuren ebenso zufriedenstellend mit Diazomethan wie die entsprechenden Säurechloride. Dies steht in gutem Einklang mit den Ergebnissen von TARBELL [18]. Wird die Carboxylgruppe mittels N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) aktiviert, verläuft die Reaktion etwas langsamer, und wegen des dabei entstehenden NN'-Dicyclohexylharnstoffs ist das Diazoketon schwerer zu gewinnen. Die aktivierten Ester von Acylaminosäuren (z.B. *p*-Nitrophenylester, Pentachlorphenylester) reagieren nicht mit Diazomethan. Am vorteilhaftesten werden zur Synthese der Diazoketone die gemischten Anhydride der leicht zugänglichen Benzyloxycarbonyl- oder der *tert*-Butyloxycarbonyl-aminosäuren verwendet, wenn auch manchmal die Ausbeuten niedrig sind.

Nicht nur Acylaminosäuren, sondern auch Dipeptide sind zur Diazoketonsynthese geeignet. So haben wir aus Benzyloxycarbonylleucyl-glycin mit Hilfe von Chlorkohlensäureäthylester mit guter Ausbeute das Benzyloxycarbonylleucyl-glycylidiazomethan herstellen können.

Die aus den Acylaminosäuren synthetisierten Diazoketone sind in der Regel gelblich-grüne, kristalline Verbindungen (die Prolinderivate konnten wir nicht kristallin erhalten). Ihre Reinheit wird außer durch die Elementaranalyse auch mittels IR-Spektroskopie erwiesen: sämtliche synthetisierten Diazoketone zeigen ein scharfes Absorptionsmaximum bei 2100 cm^{-1} .

WOLFFsche Umlagerung eines aus einer Acylaminosäure hergestellten Diazoketons in Gegenwart von α -Aminosäureester liefert ein Dipeptid mit einem β -Aminosäurerest [19]. So haben wir z.B. aus α -Phthalimido- α -diaz-aceton mit Glycinebenzylester Phthalyl- β -alanyl-glycin-benzylester synthetisiert.

Die Herstellung weiterer Diazoketone aus anderen Benzyloxycarbonyl- und *tert*-Butyloxycarbonyl-aminosäuren bzw. die Synthese von β -Aminosäuren und Diazo- β -aminosäuren ist im Gange.

c) *Für die Peptidsynthese geeignete optisch aktive Pipecolinsäurederivate*

In zahlreichen biologisch aktiven Peptiden kommt die, eine NH-Gruppe enthaltende, „proteinogene“ eiweißbildende Aminosäure Prolin vor. Unter anderem enthalten das Bradykinin und das Oxytocin, aus den wohlbekannten Aminosäuren bestehende Peptide, welche Träger bedeutsamer biologischer Funktionen sind, drei bzw. einen Prolinrest. Substitution dieser Prolinkomponenten zeitigt beträchtliche biologische Veränderungen [20]. Für eine solche Substitution kommt z.B. die als Analogon des Prolins aufzufassende L-Pipecolinsäure (Piperidin-2-carbonsäure) in Betracht, die aus zahlreichen Pflanzen isoliert worden ist, da sie eine im Pflanzenreich ziemlich häufig vorkommende Verbindung darstellt und in den pflanzlichen Stoffwechselprozessen eine gewisse Praecursorrolle einnimmt [21].

Im Schrifttum berichten drei Mitteilungen über die Verwendung der L-Pipecolinsäure bei peptidchemischen Arbeiten. KATCHALSKI und Mitarb. [22] teilen die Anwendung der Pipecolinsäure beim Studium kollagener Modelle mit, NICOLAIDES und Mitarb. [23] bedienen sich ihrer bei der Synthese von Bradykinin-Analoga und BEŠPALOVA und Mitarb. [24] bei der Synthese von Oxytocin-Analoga. Die zuletzt genannten Autoren teilen keine Einzelheiten über die Herstellung der in ihren Arbeiten benutzten, im Schrifttum unbekannten Derivate mit.

Da die Pipecolinsäure nur als Racemat im Handel ist, für unsere peptidchemischen Arbeiten aber optisch aktive Stoffe erforderlich sind, spielt bei solchen synthetischen Arbeiten eine mit möglichst wenig Verlusten einhergehende, zu optisch möglichst reinen aktiven Antipoden führende Spaltungsmethode eine Schlüsselrolle. Die Schwächen der seit langem ausgearbeiteten und benutzten MENDESCHEN Spaltungsmethode [25] mittels Weinsäure, ihrer Modifikationen, wie auch der enzymatischen Verfahren sind bekannt. Nimmt man noch hinzu, daß bei peptidsynthetischen Arbeiten die optisch aktiven Aminosäuren, je nach der Art des Einbaues, zumindest entweder an der α -Amino- oder an der Carboxylgruppe vorübergehend geschützt werden müssen, so erscheint die Anwendung des Prinzips der von VÖGLER und LANZ [26] beschriebenen Methode bei der Darstellung der optisch aktiven L- und D-Pipecolinsäuren höchst günstig. Das Verfahren beruht auf der fraktionierten Trennung der aus L-Tyrosinhydrazid und der Benzyloxycarbonyl-DL-pipecolinsäure hervorgehenden diastereomeren Salzpaare auf Grund der großen Löslichkeitsdifferenzen. In diesem Falle können beide Antipoden mit geringem Verlust, d.h. mit großen Ausbeuten, in optisch reinem Zustand isoliert werden. Vorteilhaft ist dabei, daß sie gleich in geschützter Form anfallen, wie sie bei der weiteren Verwendung zu peptidsynthetischen Arbeiten erforderlich sind. Im Laufe der Spaltung konnten die beiden Stereoisomere in Gestalt von Benzyloxycarbonyl-L-pipecolinsäure-dicyclohexylaminsalz und Carbobenzoxyl-D-pipecolinsäure in optisch reiner Form isoliert werden.

Im Laufe dieser Arbeiten gelang uns die Herstellung mehrerer in der Literatur bisher nicht ausführlich beschriebener Derivate, in denen die Iminogruppen durch eine Benzyloxycarbonylgruppe geschützt sind. Unter Anwendung der Dicyclohexylcarbodiimid-Kupplungsmethode gelang es, die aktivierten *p*-Nitrophenyl- und Pentachlorphenylester dieser Benzyloxycarbonyl-L- und -D-pipecolinsäuren herzustellen [27, 28]; die *p*-Nitrophenylester sind Öle; die Pentachlorphenylester kristallisieren. Bei der Bereitung der Benzyloxycarbonyl-derivate bedienten wir uns einer modifizierten Form der von ZERVAS und Mitarb. [29] eingeführten Acylie-

runzungsmethode; die Vorschrift dieser Autoren [30] war auch die Grundlage für die Darstellung von Nitrophenylsulfenyl-L- und D-pipecolinsäuren, deren stabile Dicyclohexylaminsalze isoliert wurden. Wir haben auch die im Schrifttum ebenfalls unbekannten Butyloxycarbonyl-L- und D-pipecolinsäure nach der abgewandelten Methode von SCHNABEL [31] dargestellt, wobei unter Konstanzhaltung des pH-Wertes des Reaktionsgemisches für kontinuierliche Einspeisung der erforderlichen Natriumhydroxydlösung gesorgt werden mußte.

Literatur

- [1] Bell, E. A.: *Nature* **203**, 378 (1964).
- [2] Fowden, F.: *Ann. Rev. Biochem.* **33**, 173 (1964).
- [3] Ivánovics, G. V. Bruckner: *Z. Immunitätsforsch.* **90**, 304 (1937).
- [4] Kovács, J., V. Bruckner: *Research* **5**, 194 (1952).
- Bruckner, V., J. Kovács, K. Kovács, H. Nagy: *Experientia* **9**, 63 (1953).
- [5] Baeyer, A.: *Ann.* **131**, 291 (1864).
- [6] Schneider, F.: *Biochem. Z.* **291**, 328 (1937).
- [7] Frankel, M., M. Harnik: *J. Amer. Chem. Soc.* **75**, 78 (1953).
- [8] Kovács, K., J. Czombos, B. Matkovics: *Acta Chim. Hung.* **50**, 365 (1966).
- [9] Arndt, F., B. Eistert, W. Partale: *Ber. dtsh. Chem. Ges.* **60**, 1364 (1927).
- [10] Bachmann, W. E., W. S. Struve: „Organic Reactions”, Vol. 1, p. 38 (1961).
- [11] Weygand, F. W., H. J. Bestmann: „Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie”, Bd. 3, S. 250 (1961).
- [12] Dion, H. W. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 3075 (1956).
- [13] Lane, J. F., E. S. Wallis: *J. Org. Chem.* **6**, 443 (1941).
- [14] Balenović, K.: *Experientia* **3**, 369 (1947); *Croat. Chim. Acta* **28**, 303 (1956).
- [15] Karrer, P., G. Bussmann: *Helv. Chim. Acta* **24**, 645 (1941).
- [16] Weygand, F., H. J. Bestmann, E. Klieger: *Chem. Ber.* **91**, 1037 (1958).
- [17] Rudinger, J., H. Farkašova: *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.* **28**, 2941 (1963).
- [18] Tarbell, D. S., J. A. Price: *J. Org. Chem.* **22**, 245 (1957).
- [19] Fleš, D., M. Markovac-Prpić: *Croat. Chim. Acta* **28**, 73 (1956).
- [20] Schröder, E., K. Lübke: „The Peptides”, Vol. 2. Acad. Press, New York — London, (1966).
- [21] Greenstein, J. P., M. Winitz: „Chemistry of the Amino Acids”, Wiley, New York, (1960).
- [22] Katchalski, E., A. Berger, J. Kurtz: *Internat. Symposium on Protein Structure and Crystallography*, Madras, 1963. Acad. Press, London, p. 205.
- [23] Nicolaides, E. D., H. A. De Wald, M. K. Craft: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **104**, 15 (1963).
- [24] Bespalova, Z. D. et al.: *Vest. Leningrad. Univ., Ser. Fiz. Chim.* **21**, 157 (1966).
- [25] Mende, F.: *Ber. dtsh. Chem. Ges.* **29**, 2887 (1869).
- [26] Vogler, K., P. Lanz: *Helv. Chim. Acta* **49**, 1348 (1966).
- [27] Bodanszky, M., V. du Vigneaud: *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 5688 (1959).
- [28] Kovács, J. et al.: *J. Org. Chem.* **32**, 3696 (1967).
- [29] Bergmann, M., L. Zervas: *Ber. dtsh. Chem. Ges.* **65**, 1192 (1932).
- [30] Zervas, L., D. Borovas, E. Gazis: *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 3660 (1963).
- [31] Schnabel, E.: *Ann.* **702**, 188 (1967).

СПЕЦИАЛЬНЫЕ НЕПРОТЕИНОГЕННЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ПРИГОТОВИТЬ ПЕПТИДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ

К. Ковач, Б. Пенке, Й. Цомбош, Ц. Петреш, Л. Балашпери

Амино кислоты и пептидные производные составляют интересную область химии пептидов. Авторы докладывают о приготовлении аминокислот, диазокетонов полученных из ацил-амино-кислот и также пипекוליновой кислоты и её пептидов. Перераспределение диазокетонов ведёт к оптически активным β-амино кислотам: